

THESIS

MUNICH

1966

KANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIV
300 PASTEUR DR.
PALO ALTO, CALIF.

° VERSUCHE ZUR ZWEIDIMENSIONALEN
DÜNNSCHICHT-CHROMATOGRAPHIE
VON AMINOSÄUREN

Abbas Behrouz

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

VERSUCHE ZUR ZWEIDIMENSIONALEN
DÜNNSCICHT-CHROMATOGRAPHIE
VON AMINOSÄUREN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Abbas Behrouz
aus Esfahan/Iran

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Prof. Dr. N. ZÖLLNER
Korreferent:	Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 1. 1966

MEINER LIEBEN MUTTER
IN DANKBARKEIT GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153513_0187

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	Seite
Einleitung:	7
<u>I - Methodik:</u>	
1. Herstellung des Adsorbens (Platten)	9
2. Herstellung eines Serumextraktes auf Aminosäuren	9
3. Vorbereitung der Chromatographie-Kammer	11
4. Auftragen des Extraktes	12
5. Lösungsmittel (Laufmittel)	13
6. Entwicklung	14
7. Färbung	14
8. Die Bestimmung der Rf.-Werte der Aminosäuren	15
Rf.-Werte bei dem 1. Laufmittel	17
Rf.-Werte bei dem 2. Laufmittel	19
9. Versuche mit Aminosäuren	19
a) I. Versuch	20
b) II. Versuch	20
Die Ergebnisse aus dem I. und II. Versuch	21
<u>II - Versuch mit Bioor-Serum-Extrakt</u>	
a) Mit Petroläther	22
Sperryextrakt	22
b) Ohne Petroläther	24
<u>III - Versuch mit Trichloreisessig</u>	25
Diskussion	26
Literatur	29

E I N L E I T U N G .

Die Trennung der Aminosäuren durch zwei dimensionale Dünnschichtchromatographien ist ein ganz neues Verfahren. Sie ergänzt durch die Vereinfachung der Chromatographie-Technik die bisher angewandten Methoden wie etwa Papier- und Säulenchromatographie bzw. Ionenaustauscher.

In der älteren Literatur wurde vielfach das säulenchromatographische (1) Verfahren zur Trennung der Aminosäuren mitgeteilt. Diese Methode wurde nicht als ein ideales Verfahren angesehen. Sie ist ungeeignet für die Identifizierung der Aminosäuren wegen des grossen Bedarfs an Untersuchungsmaterial, unzureichendem Trennungsvermögen und erheblichem Zeitaufwand. Außerdem sind die Anschaffungskosten der Apparate und der Materialverbrauch sehr hoch.

Durch die Papierchromatographie (2) (mit Boratpuffer - Ph 9,3 - gepuffertes Wathmanpapier Nr. 1) ist eine ausreichende Trennung zur Identifizierung der Aminosäuren möglich, Sie erlaubt jedoch nicht die quantitative Bestimmung der Substanzen, außerdem zerreißt das Chromatogramm nach der Behandlung mit einzelnen Reagenzien die zur Entwicklung bzw. der Darstellung der Aminosäuren notwendig sind, so daß die genaue Lokalisation der Substanzflecken erschwert ist.

Der Ionenaustauscher (3) befaßt sich nur mit einzelnen Eiweißfraktionen des Plasmas.

Nach neuester Mitteilung von BRENNER und NIEDERWEISER (4) hat sich die zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie als einfachste Methode erwiesen. Sie ermöglicht in bedeutend kurzer Zeit sowie in quantitativer und qualitativer Auswertung eine exakte Trennung der Aminosäuren.

Als Adsorbent benutzt man Kieselgel G (E. Merk). Die Überschichtung erfolgt durch ein von Stahl (5) konstruiertes Streichgerät, womit eine gleichmäßige Adsorptions-schicht geschaffen wird. Die dünnschichtchromatographischen Methoden der Eiweißchemie wurden mehrfach mitgeteilt (6,7).

Die nachfolgend beschriebene Arbeit befaßt sich mit der Trennung und Identifizierung der Serumamino-säuren und bestimmt den vorhandenen Aminosäurenbestand des menschlichen Plasmas.

1. Herstellung des Adsorbens (Platten)

1.) Herstellung des Adsorbens (Platten)

Bei diesem Versuch wird etwa 50 gr. Kieselgel G (E. Merck) mit 65 ml dest. Wasser in einem Mörsel ca. 70 Sek. sehr kräftig umgerührt und sofort in ein sauberes, vorher bereitgestelltes Streichgerät gegossen. Das Gerät wird vorsichtig über die vorbereiteten und mit Chloroform entfetteten 5 Stück nebeneinandergelegten quadratischen Glasplatten von 20 cm Kantenlänge geführt, wodurch eine dünne Schicht entsteht. Die Abbindezeit beträgt ca. 2 Minuten. Es wird empfohlen, diese Platten mindestens 10 Stunden unberührt an der Luft liegen zu lassen. Niemals mit dem Föhn oder in beweglicher Luft trocknen, da sonst verschiedene Schichtwellen entstehen. Um die getrockneten Platten gegen Feuchtigkeit und Laborgas zu schützen, werden sie in einem Spezialschrank aufbewahrt, auf dessen Boden sich Blau-Gel in kristallform befindet.

Vor dem Gebrauch der Platten müssen zur Sicherheit entstandene unbrauchbare Schichten an den Rändern mit Daumen und Zeigefinger abgestreift werden, um eine scharfe Begrenzung herzustellen.

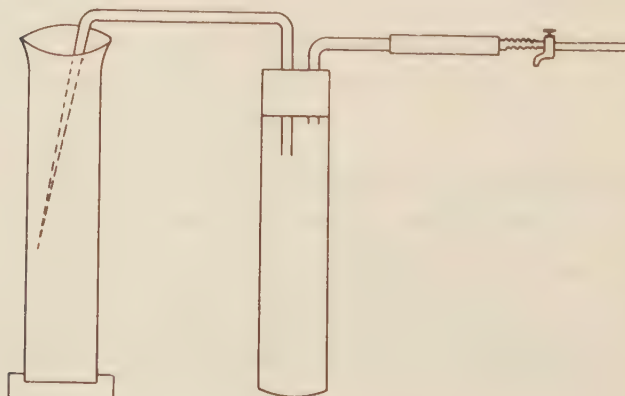
2.) Herstellung eines Serumextraktes auf Aminosäuren.

8,3 ml Methanol werden in einen 25 ml Meßkolben gebracht, und unter schütteln des Kolbens pipetiert man tropfenweise 1 ml Serum ein. Der dabei entstehende flockige Niederschlag wird mit 9 ml Chloroform aufgefüllt, in einem Wasserbad sehr vorsichtig

bei etwa $65 - 70^{\circ}\text{C}$ kurz aufgekocht und sofort unter kaltem fließenden Wasser abgekühlt. Nach vollkommener Abkühlung wird der Meßkolben mit Chloroform so aufgefüllt, daß der Inhalt 25 ml erreicht und der untere Rand des Miniskus vollständig mit der Markierung (Ringmarke) des Kolbens in einer Ebene steht. Anschließend wird es filtriert.

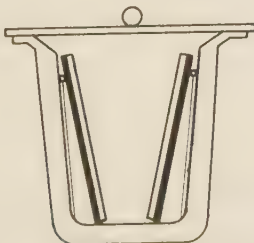
Vom Filtrat werden 20 ml in einen Schüttelzylinder gebracht und mit 4 ml einer 20 %igen CaCl_2 -Lösung überschichtet. Nach dem Verschließen des Zylinders muß 5 Min. kräftig geschüttelt und das Gemisch etwa 10 Stunden stehengelassen werden.

Die Lösung teilt sich allmählich in 2 scharf begrenzte Phasen. Die obere Phase, die etwa 10 ml beträgt, wird zur genaueren Volumenbestimmung abgelesen, notiert und mit Hilfe einer Glaskapillare die an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist in einem Reagenzglas abgesaugt und zur weiteren Bearbeitung dicht verschlossen aufbewahrt. (Siehe Figur 1)



3.) Vorbereitung der Chromatographie-Kammer.

Ein gutes, zufriedenstellendes Chromatogramm und gleichmäßig laufendes Lösungsmittel, hängt im allgemeinen immer von der Sättigung der Kammerluft ab. Wenn die Kammerluft nicht vollständig mit Elutionsmitteln gesättigt ist, wird das Lösungsmittel nicht gleichmäßig in einer Ebene aufsteigen, sondern schräg oder kurvenähnlich. Außerdem gibt es ein unzufriedenes Resultat, weil die aufgetragenen Substanzen keine vollkommene Trennung ergeben, oder sie können ihren normalen Rf. Wert nicht erreichen. Außerdem muß die Kammer vollkommen dicht abgeschlossen sein, um möglichst jede Entweichung von Elutionsmitteln zu verhindern. Die fortlaufende Verdunstung macht sich bei der Trennung so bemerkbar, daß alle Substanzen sich über eine größere Fläche ausdehnen und bei der Färbung verschwommene diffuse Flecken ergeben. Zur Verhinderung aller Abweichungen und Gewinnung eines idealen Chromatogramms werden vier Innenwände der Kammer mit einem gut saugfähigen Papier bekleidet. An beiden Breitseiten der Kammer-Innenwände werden zwei Glasstäbe angebunden, um eine Berührung der Adsorbtionsschicht mit diesem mit Laufmittel vollgetränkten Papier zu vermeiden (Abb. 2).

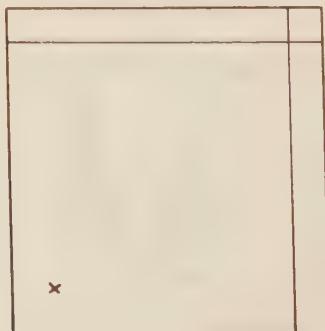


Nach dem Abfertigen der Kammer wird das Lösungsmittel in diese eingegossen, so daß der Kammerboden ca. 0,5 cm mit dem Elutionsmittel bedeckt ist. Sie wird mit dem Deckel zugedeckt und leicht geschüttelt; man kann auch die Kammer in verschiedene Richtungen etwas beugen, damit das Papier vollkommen getränkt wird. Zur Ergänzung wird die Kammer etwa 2-3 Stunden stengelassen, da während dieser Zeit die vollständige Raumsättigung erreicht wird.

4.) Auftragen des Extraktes

Hierzu sollte bemerkt werden, daß die Platte zur Frontstellung zuerst von 2 Seiten, und zwar je 2 cm vom Rand entfernt, mit 2 Linien so markiert wird, daß beide Markierungslinien zusammen einen rechten Winkel bilden.

Diese Linien verhindern einen übermäßigen Anstieg des Lösungsmittels, so daß der Abschluß des Entwicklungsvorganges genau festgestellt werden kann. Weiterhin wird die Berechnung der Rf-Werte nach Identifizierung der Substanzen vereinfacht. Die Substanzen werden pendant zu dem genannten Winkel auf einem vorher mit der Spitze eines Bleistiftes markierten Punkt so aufgetragen, daß der Startpunkt jeweils 2,5 cm von den beiden Plattenrändern entfernt ist. (Abb. 3).



Es ist dabei zu beachten, daß das Auftragen möglichst in kleinen Mengen erfolgt und das Kieselgel vor erneutem Auftragen gut getrocknet ist, so daß die Substanzen auf einem kleinen Punkt bleiben und sich nicht auf einer großen Fläche ausdehnen. Zur Beschleunigung des Vorganges wird unter dem Auftragungspunkt durch einen Spezialapparat einige Grade Wärme entwickelt, damit das Lösungsmittel schneller trocknet. Aus dem, wie beschrieben, gewonnenen Serumextrakt wird 1 ml in ein anderes Reagenzglas gegeben und auf schwacher Flamme vorsichtig eingedickt, bis das Volumen der Lösung etwa 0,04 - 0,05 beträgt. Es wird dann mit einer Spezialpipette (auf 1 l graduert), wie beschrieben, auf den Startpunkt aufgetragen. Die Lösung darf niemals bis zur Trocknung einedampft und wieder in Chloroform oder ähnlichem aufgenommen werden. Die Aminosäuren würden danach entweder vollkommen verschwinden oder bei der Färbung wenig Farbe aufnehmen, so daß sie kaum zu identifizieren wären.

5.) Lösungsmittel (Laufmittel)

Da die Entwicklung zweidimensional erfolgt, sind zwei Elutionsmittel notwendig. Als Laufmittel verwendete man bisher vielfach verschiedene Mischungen, wie z.B. eine Mischung aus 96 %igem Äthanol und dest. Wasser im Verhältnis 6,3 : 3,7 oder n-Propanol und dest. Wasser im Verhältnis 6,4 : 3,6.

Besonders empfehlenswert für das 1. Laufmittel ist nach unserer Erfahrung eine Mischung aus n-Butanol, Eisessig, dest. Wasser (60 - 20 - 20). Für das zweite Laufmittel ist die Mischung aus Phenol und dest. Wasser (75: 25) zu empfehlen. Beide Lösungsmittel müssen nach der Mischung 10 Minuten lang kräftig geschüt-

telt werden. Das zweite Lösungsmittel ist nur nach 10stündigem Stehen und Beseitigung der oberen Phase verwendbar.

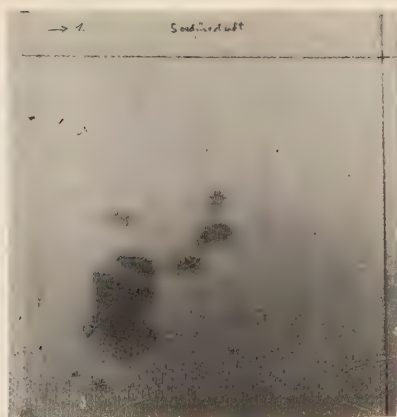
6.) Entwicklung

Zur Entwicklung sind zwei Chromatographie-Kammern notwendig. Nach der üblichen Vorbereitung wird die Platte vorsichtig in das erste Lösungsmittel eingetaucht und die Kammer wieder fest verschlossen. Die Laufzeit beträgt ca. 8 Stunden. Die Platte muß so lange in der Kammer bleiben, bis das Lösungsmittel die Abschlußlinien erreicht hat. Die Platte wird dann sehr vorsichtig aus der Kammer herausgenommen und mindestens 7 Stunden an der Luft stehen gelassen. Nach vollkommener Trocknung wird sie um 90° gedreht und in dem 2. Chromatographie-System entwickelt. Die Laufzeit beträgt hier ca. 7 Stunden. Nach der Herausnahme ist die Platte erst nach 12stündigem Stehen im Abzug zu färben.

7.) Färbung

Färbung: Darstellung der einzelnen auf der Platte getrennten Aminosäuren erfolgt am besten mit Hilfe der Niuhydrinreaktion. Es werden 100 mg Niuhydrin in 100 ml Äthylalkohol aufgelöst und nach Zugabe von 2 ml Colidin und 15 ml Eisessig gut durchgemischt. Die Lösung wird mit Hilfe eines Zerstäubers unter Stickstoff-Druck auf die Platte gesprüht, so lange bis die Plattenfläche vollkommen angefeuchtet ist. Die Platte wird im Ofen bei $110 - 120^{\circ}$ C für 10 Minuten erhitzt. Nach der Herausnahme der Platte sind die Aminosäuren durch die Niuhydrinfärbung als rötlich blaue und kirsch-violette Flecken sichtbar.

(Abb. 4)



Diese Farben sind aber nicht stabil. Sie verschwinden nach ca. 5 Tagen, wenn die Platte an die Luft gestellt wird. Sollte aus technischen Gründen die Sichtbarkeit der Färbung erhalten bleiben, wird diese Platte mit einer zweiten ungeschichteten Platte gut abgedeckt und an den Rändern befestigt.

8.) Die Bestimmung der Rf.-Werte der Aminosäuren.

Zur Rf.-Bestimmung wird von jeder Aminosäure eine äquimolekulare Menge von 200 μ Mol. genommen.

Beispiel: Das Molkulargewicht (MG) von Alanin beträgt 89,09.

Ein μ Mol. ist dementsprechend 89,09 γ . Infolgedessen ist

die erforderliche Menge: $\frac{89,09 \gamma \times 200}{1000} = 17,818 \text{ mg.}$

Für die anderen Aminosäuren gilt dasselbe. Siehe Tabelle 1.

Tabelle 1

Name:	MG	Erforderliche Menge
Alanin	89.09	17,818 mg
Lysin	146.19	29.238 mg
Asparagin	132.28	26.428 mg
Glycin (Glykokol)	75.07	15.014 mg
Threonin	119.12	23.824 mg
Prolin	115.13	23.026 mg
Valin	117.15	23.430 mg
Tryptophan	204.22	40.844 mg
Phenylalanin	165.19	33.038 mg
Leucin	131.17	20.234 mg
Cystin	240.17	48.034 mg
Histidin	115.16	31.032 mg
Arginin	246.27	49.254 mg
Asparaginsäure	133.10	16.620 mg
Cystein	121.15	24.230 mg
Serin	105.09	21.018 mg
Glutaminsäure	147.13	29.426 mg
Tyrosin	181.19	36.238 mg
Methyonin	149.21	29.842 mg
Isoleucin	131.17	26.234 mg
Oxyprolin	133.13	26.626 mg

Wie aus der oben angeführten Tabelle zu ersehen ist, wird jede einzelne Aminosäure in ein eigenes Reagenzglas gegeben. Es werden 2 ml $1/n$ Hcl darauf pipetiert und mit $0,1/n$ Hcl nachgefüllt, bis der Inhalt 10 ml beträgt. Aus dieser Amino-

säure-Hcl-Mischung werden 0,004 ml auf eine Platte aufgetragen, und zwar so, daß für jede Aminosäure extra eine Bahn entsteht. Nach der Entwicklung mit dem 1. Laufmittel in einer Dimension und Färbung ergeben sich folgende Rf.-Werte:

(Siehe Tabelle 2 und Abb. 5).

Abb. 5

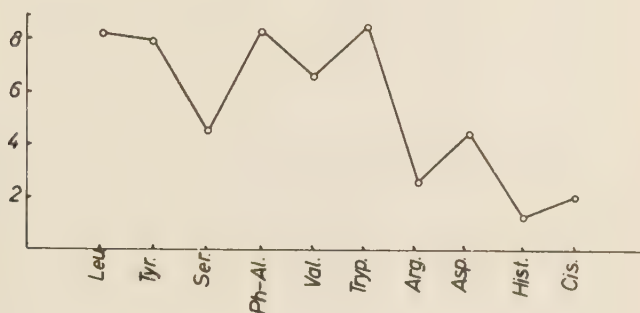


Tabelle 2

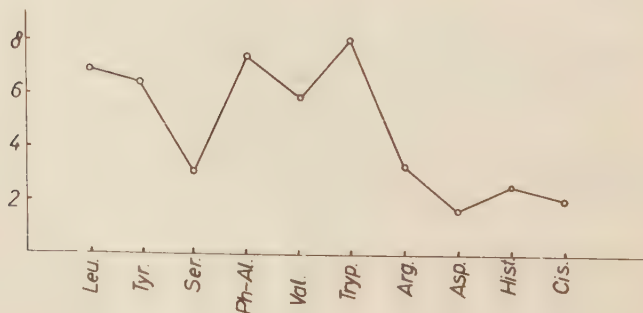
Rf.-Werte bei dem 1. Laufmittel.

Leucin	$R_f = \frac{8.2}{15.5} = 0.529$
Tyrosin	$R_f = \frac{8.0}{15.5} = 0.516$
Serin	$R_f = \frac{4.5}{15.5} = 0.296$
Ph-Alanin	$R_f = \frac{8.3}{15.5} = 0.529$

Valin	$R_f = \frac{6.5}{15.5} = 0.419$
Tryptophan	$R_f = \frac{8.5}{15.5} = 0.542$
Arginin	$R_f = \frac{2.5}{15.5} = 0.103$
Asparagin	$R_f = \frac{4.5}{15.5} = 0.296$
Histidin	$R_f = \frac{1.2}{15.5} = 0.077$
Cistin	$R_f = \frac{2.0}{15.5} = 0.139$

Für die R_f -Bestimmung beim zweiten Laufmittel wird zuerst eine Platte leer mit dem ersten Laufmittel in der 1. Dimensional entwickelt und getrocknet. Nun werden die gleichen Aminosäuren in gleicher Reihenfolge wie beim oben genannten Versuch auf die Platte aufgetragen und in der 2. Dimensionsrichtung im zweiten Laufmittel entwickelt. Nach der Färbung ergeben sich folgende R_f -Werte. (Siehe Tabelle 3 und Abb. 6).

Abb. 6



Rf-Werte beim 2. Laufmittel.

Leucin	$Rf = \frac{7}{14.5} = 0.483$
Tyrosin	$Rf = \frac{6.5}{14.5} = 0.414$
Serin	$Rf = \frac{3}{14.5} = 0.207$
Phenylalanin	$Rf = \frac{7.5}{14.5} = 0.517$
Valin	$Rf = \frac{5.8}{14.5} = 0.400$
Tryptophan	$Rf = \frac{8.1}{14.5} = 0.570$
Arginin	$Rf = \frac{3.2}{14.5} = 0.220$
Asparagin	$Rf = \frac{1.5}{14.5} = 0.103$
Histidin	$Rf = \frac{2.5}{14.5} = 0.170$
Cistin	$Rf = \frac{2}{14.5} = 0.138$

9.) Versuche mit Aminosäuren

Um ein Übersichtsbild zur Identifizierung der Aminosäuren sowohl aus einer Mischung als auch aus jeder einzelnen Aminosäure zu erhalten, werden folgende Versuche durchgeführt:

- a) Bei diesem Versuch werden einige Aminosäuren von je 0.004 ml auf eine Platte, und zwar alle auf den Startpunkt aufgetragen und nach der Entwicklung in zwei Dimensionen in dem 1. und 2. Laufmittel gefärbt (I. Versuch).

Abb. 7



Dieser Versuch verliert an Genauigkeit, da es sehr schwierig ist, alle Substanzen auf einen kleinen Punkt aufzutragen. Außerdem wird die Adsorptionsschicht an dem Auftragsort von den vielen Voluminas abgeschwemmt und durch die unvermeidbare Berührung der Pipettenspitze zerkratzt.

- b) Um genaue Werte zu erhalten wird jede Aminosäure extra auf eine Platte aufgetragen. Alle Platten werden wie oben erwähnt mit dem ersten und zweiten Laufmittel entwickelt und gefärbt. Die entstandenen Flecken werden jeweils zum Aufbewahren von der Platte auf ein Transparentpapier abgemahlt. (II. Versuch).

Die Ergebnisse sind aus Tabelle 4 zu ersehen.

Tabelle 4

Namen	I. Versuch		II. Versuch	
	→ 1.	→ 2.	→ 1.	→ 2.
Serin	4.5	2.5	4.5	3
Leucin	8	6.5	8	6.5
Histidin	1.9	2	1.8	2.5
Tyrosin	7.3	5.8	7.5	5.8
Valin	7	5.1	6.8	5.3
Ph-Alanin	8.3	6.9	8.3	7.1
Tryptophan	8.5	7.6	8.4	7.9
Asparagin	4.5	0.9	5	1
Arginin	2	2.5	2	2.9
Cistin	1.5	1.3	1.8	1.5
Asparagin-Säure	4.5	0	4.5	0.1
Glutamin-Säure	5.3	0.5	4.8	0.6
Isolencin	7.9	7.1	8	7
Oxyprolin	5.1	5.5	4.7	5.1
Prolin	4.5	8	4	7.8
Lysin	1	2	1.1	2.2
Cystein	2.5	1.5	2.3	1.7
Glycin	3.9	2.9	4.1	3.2
Alanin	4.5	3.9	4.6	3.5
Threonin	5.2	2.9	5.7	3.3

II. B. Versuch mit Bloor-Serum-Extrakt

a) Mit Petroläther

In ein mit 40 ml Bloorextrakt (30 ml Äthanol mit 10 ml Diäthyläther) angefülltes Becherglas wird 1 ml Serum einpipettiert. Die Mischung wird bis zum vollständigen Verdampfen vorsichtig aufgeköcht. Der Rückstand wird dann in etwa 10 ml Petrol-Äther aufgenommen und in einen Schüttelzylinder einfiltriert. Das Glas wird zweimal mit Petroläther ausgewaschen und durch den gleichen Trichter filtriert, wodurch ein übermäßiger Substanzverlust verhindert wird. Anschließend wird es im Wasserbad bei 50 °C unter gleichzeitigem vorsichtigen Schütteln eingedampft und mit Hilfe der Stickstoffatmosphäre vollkommen unter leichtem Druck eingetrocknet. Nach vollständiger Eintrocknung wird Sperry- (8)- Extrakt vorgenommen.

Sperryextrakt

Der Rückstand wird in einer Mischung von 13.2 ml Chloroform und 6.6 ml Methanol aufgenommen und mit 4 ml einer 20 %igen CaCl_2 Lösung überschichtet. Der Schüttelzylinder wird 5 Minuten kräftig geschüttelt und für 10 Stunden stehengelassen.

Es entstehen wieder zwei Phasen. Die obere Phase wird abgelesen und notiert; sie beträgt ca. 9 ml. Das Auftragen von der oberen Phase auf die Platte ist genauso wie bei dem vorher erwähnten Serumextrakt. Zum Vergleich für den oben genannten Versuch wird eine verhältnismäßig gleiche Menge aufgetragen. Da bei dem Serumextrakt die obere Phase 10 ml betrug und davon 1 ml aufgetragen wurde, ist hier entsprechend zu 9 ml Gesamtvolumen 0.9 ml aufzutragen. Die aufzutragende Menge beträgt demnach bei beiden Versuchen $1/10$ des Gesamtvolumens. Nach der Entwicklung und Färbung werden die Aminosäuren wie beschrieben identifiziert. (Siehe Abb. 9).



b) Ohne Petroläther

Es werden hier wie beim letzten Versuch 1 ml Serum mit 40 ml Bloor-Extrakt zusammengegeben aber im Gegensatz zum letzten Versuch nicht eingetrocknet, sondern auf ca. $\frac{1}{6}$ des Gesamtvolumens eingedampft. Die Substanz wird in einen Schüttelzylinder gegeben in welchem sie ausschließlich im Wasserbad bis zur Trocknung eingedampft wird.

Nach vollständiger Eintrocknung evt. mit Hilfe einer Stickstoffatmosphäre wird wie beim letzten Sperryextrakt vorgenommen. Es wird 5 Minuten kräftig geschüttelt und nach 10 Stunden Stehen 0.9 ml (Gesamtvolumen 9 ml) von der oberen Phase eingedickt und aufgetragen. Abb. 10.



III. Versuch mit Trichloreisessig

Es wird 1 ml Trichloreisessig in ein Zentrifugenglas gegeben, 1 ml Serum hinzupipettiert und mit 2 ml bidest. Wasser nachgefüllt. Nach entstandenem flockigem Niederschlag wird etwa 5 Minuten zentrifugiert. Die oben stehende Lösung wird vom Niederschlag in einen kleinen Schüttelzylinder abgetrennt. Die Lösung wird mit ca. 4 ml Äther einige Male gewaschen und mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe vom überschüssigen Äther abgetrennt. Die Waschung wird so lange wiederholt, bis das Extrakt schwach sauer reagiert und der PH Wert ca. 5-6 beträgt. Bei dem Versuch muß die aufgetragene Menge des Extraktes 0.3 - 0.33 ml betragen. (Siehe Vergleich mit Versuch a) Abb. 11.



D i s k u s s i o n

- a) Bei dem Versuch mit Serumextrakt nach Sperry ist zu beachten, daß nach der Entwicklung und Färbung ein Teil der Aminosäuren, der den Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin, Alanin, Glycin, und Serinflecken entspricht, nicht zur Darstellung kommt. Dagegen aber reichlich Histidin, Cystin, Cystein, Arginin und Lysin vorhanden sind.
- Die restlichen vorhandenen Aminosäuren erscheinen nach einer Reihenfolge die der Entwicklungsrichtung entspricht. Neben dieser Gruppe erscheint noch eine Aminosäurengruppe, die im einzelnen nicht definiert wurde.
- b) Der Versuch mit Trichloreisessig ergibt wiederum dieselben Aminosäureverhältnisse wie beim Versuch a) mit dem Unterschied, daß die Aminosäureflecken nicht wie oben intensiv aber so, daß die gerade als schwache Flecken im Cystin, Cystein, Arginin und Histidin-Fleckenfeld zu differenzieren sind, erscheinen. Weiterhin kommen hier im Gegensatz zu dem obigen Versuch kleine Mengen von Serin und Glycin zur Darstellung.
- c) Bei dem Versuch mit Bloor ohne Petroläther ist ein neuer Fleck direkt neben dem Startpunkt zu identifizieren. Die anderen Aminosäuren erscheinen mit dem selben Verhältnis wie beim Versuch b). Die Farbintensität ist hier aber etwas reduziert, so daß alle Aminosäuren als schwach sichtbare Flecken gefärbt sind.
- d) Der Versuch "Bloor mit Petroläther" zeigt, daß nach der Behandlung des Serumextraktes mit PETROL-ÄTHER fast alle Aminosäuren

aus dem Chromatogramm verschwinden, da sie wahrscheinlich bei der Herstellung nicht in Petroläther aufgenommen werden.

Es erscheinen lediglich 3 stark gefärbte Flecken, die dem Arginin, Cystin und Cystein entsprechen.

Die o.a. Ergebnisse zeigen, daß bei jedem Versuch ein Teil der Aminosäuren aus dem Nativserum nicht zu extrahieren ist.

Gerade zu dieser Fragestellung wurden viele Versuche mit einem Zusatz von einer einzigen Aminosäure zu dem Nativserum zur Markierung der zu untersuchenden Aminosäure durchgeführt.

Die Platten wurden wie üblich entwickelt und gefärbt.

Die unten angeführte Tabelle soll das Verhalten der einzelnen Aminosäuren bei verschiedenen Modifikationen des Serumextraktes nach der Chromatographie zeigen. Es wurden hier jeweils 0.002 - 0.004 ml einer Aminosäurelösung in 1 ml dem Nativserum zugesetzt. (Tabelle 5).

Name	B.m.P.	B.o.P.	T.c.e.	N.s.
Asparaginsäure	-	+	+	+
Glutaminsäure	-	+	+	+
Asparagin	(s)	+	+	+
Valin	+	+	+	+
Tyrosin	+	+	+	
Histidin	+	+	+	
Lysin	+	+	+	
Alanin	-	+	+	
Tryptophan	-	+	+	

B.m.P. = Bloor mit Petroläther

B.o.P. = Bloor ohne Petroläther

T.c.e. = Trichloreisessig

N.s. = Nativserum

(s) = schwach

An dieser Stelle möchte ich
Herrn Prof. Dr. N. ZÖLLNER
meinen Dank für die Überlassung
der Arbeit, die freundliche
Betreuung sowie die Übernahme
des Referates aussprechen.

L i t e r a t u r

1. H.A. Ismailow und M.S. Shraiber Farmazia 1938, Nr. 3, 1.
2. T.I. Williams Introduction to chromatographie
(Blacky & Sons, Glasgow 1947) P. 36
3. J.E. Meinnard und N.P. Hall, Anal. chem. 21, 185 (1948)
4. J.G. Kirchner, J.M. Miller und G.J. Keller, Anal. chem.
23, 420 (1953)
5. J.M. Miller und J.G. Kirchner, Anal. chem. 25, 1107 (1953)
6. J.M. Miller und J.G. Kirchner, Anal. chem. 26, 2002 (1954)
7. E. Stahl, Pharmazie, 11, 633 (1956)
8. E. Stahl, Chemie, 82, 323 (1958).

L e b e n s l a u f

Am 26. November 1933 wurde ich als Sohn des Kaufmann Mohammed-Bagher Behrouz und seiner Ehefrau Soltan, geb. Safawi, in Esfahan / I r a n geboren.

Nach der Absolvierung der Volksschule besuchte ich das Gymnasium "Sadi" in Esfahan, das ich 1952 nach bestandenen Abitur verließ.

Ein zweites "naturwissenschaftliches Fachabitur" legte ich dann im Jahre 1953 am Gymnasium "Hatef" ab.

Danach besuchte ich das Pädagogische Institut in Esfahn, das ich 1955 mit Erfolg abgeschlossen habe.

Darauf war ich ca. 1 Jahr als Lehrer an einem Knabengymnasium tätig.

Im Winter 1956-57 fuhr ich nach Deutschland (München) und begann an der Universität Medizin zu studieren.

Im Jahre 1959/60 bestand ich hier die ärztliche Vorprüfung.
Am 2.7.1964 legte ich ebenfalls in München das medizinische Staatsexamen ab.

Seitdem bin ich als Medizinalassistent in München beschäftigt.

